

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-244988

(43) 公開日 平成5年(1993)9月24日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
A 6 1 K 39/395	A B C U	8413-4C		
// C 1 2 N 15/06				
(C 1 2 P 21/08				
		8931-4B	C 1 2 N 15/00	C
			審査請求 未請求	請求項の数 4 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-83305

(22) 出願日 平成4年(1992)3月4日

(71) 出願人 000137764

株式会社ミドリ十字

大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号

(72) 発明者 鈴木 幸雄

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株

式会社ミドリ十字中央研究所内

(72) 発明者 井手野 祥二

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株

式会社ミドリ十字中央研究所内

(72) 発明者 和田 純子

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株

式会社ミドリ十字中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗組織因子モノクローナル抗体、及びこれによる免疫抑制剤

(57) 【要約】

【構成】 活性化マクロファージ細胞膜特異的マーカー組織因子 (TF) に対して特異的に結合し、活性化マクロファージによる腫瘍壊死因子 (TNF) の産生、およびリンパ球混合反応を補体存在下に抑制することを特徴とする IgG2a または IgM タイプの抗 TF モノクローナル抗体。

【効果】 本発明の抗 TF モノクローナル抗体は、臓器移植拒絶の他、活性化マクロファージの関与する細胞性免疫の亢進によってもたらされる種々の疾患に対する免疫抑制剤として有用である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト由来組織因子を免疫原として作成されたハイブリドーマの産生する以下の特性をもつモノクローナル抗体：

- ① Igクラス：IgG2aおよびIgM。
- ② 認識抗原タイプ：活性化マクロファージ特異的マーカー組織因子。
- ③ 交差反応性：IgG2a抗体はヒト胎盤由来組織因子、IgM抗体はヒト胎盤由来組織因子、イヌおよびウサギ胎盤由来組織因子と交差反応性を有する。

【請求項2】 補体存在下に混合リンパ球反応を抑制する請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 補体存在下に活性化マクロファージによる腫瘍壊死因子（TNF）の産生を抑制する請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 請求項1記載のモノクローナル抗体を有効成分とする免疫抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、抗組織因子モノクローナル抗体、及びこれによる免疫抑制剤に関する。

【0002】

【従来技術・発明が解決しようとする課題】 組織因子（tissue factor, 以下TFと略記する）は組織トロンボプラスチン（tissue thromboplastin）とも呼ばれ、血液凝固第III因子で、血液が組織液に触れたときその凝固を著しく促進する。TFは、血液凝固の際に起こるプロテアーゼの活性化連鎖反応の第一次イニシエーターで、膜内性蛋白質として凝固因子VIIとVII₂の受容体および補因子として機能する。TFとVII₂の複合体は、XとXI因子を活性化し、最終的にフィブリン塊が形成される（外因系血液凝固機序）。TFは、肺、脳、胎盤などに多量に存在し、肝、脾、腎、血管内膜などにも分布しており、これまでヒト由来のTFタンパク質、およびこれをコードする構造遺伝子も明らかにされている（特開昭63-301797および特開平1-503438号公報）。一方、本TFタンパク質と免疫反応する抗TFモノクローナル抗体は、凝固因子VII/VII₂のTFへの結合を競争的に阻害することができ、凝集や炎症反応のようなTFの凝固因子VII/VII₂への結合により開始する生理学的応答を調整するのに有用である。また、当該抗体分子を抗腫瘍試薬に結合させ調製した抗腫瘍治療組成物は、その表面上に組織因子を発現する腫瘍細胞を有する被験者に投与することもできる。実際、抗TFモノクローナル抗体を作製し、これを凝固抑制、TF発現腫瘍細胞障害の目的で利用した例が知られている（特開昭63-218625号公報及び特開平1-503438号公報）。

【0003】 一方、TFは血管内では活性化マクロファージ細胞膜に特異的に発現し、その表面マーカーとして

2

知られている [V.A.Ewan, W.Cieplinski, W.W.Hancock et al., J. Immunol. 136 : 2408-2415 (1986), S.D.Carson, D.E.Ross, R.Bach and A.Guha, Blood 70 : 490-493 (1987), Drake, J.H.Morrissey and T.S.Edgington, Amer. J. Pathol, 134 : 1087-1097 (1989), 及び P. Faulk, C.A.Labarrere and S.D.Carson, Blood 76 : 86-96 (1990)]。マクロファージは、T細胞への抗原提示機能を有する他、ヘルパーT細胞、キラーT細胞の活性化、インターロイキン1（IL1）、細胞壊死因子（TNF）などモノカインの生産、遅延型アレルギー反応の発現など様々な生体制御のシステムに深く関与している。

【0004】 免疫反応はリンパ球とマクロファージのサイトカインを介する共同作用によって増幅されることが知られている。マクロファージが関与する免疫反応の代表的な例として、臓器移植を行った際にしばしば起こる移植片による免疫応答が挙げられる。移植拒絶反応は、移植片細胞上の腫瘍組織適合性抗原クラスIIがヘルパーTリンパ球によって認識されることによって始まる。アロ特異的刺激を受けたヘルパーTリンパ球は、サイトカイン：γ-インターフェロン、GM-CSFを遊離する。マクロファージはこれらのサイトカインによって活性化され、モノカイン：IL-1、TNFを産生し、Tリンパ球の増殖を促進する。従って活性化マクロファージ機能を特異的に抑制するモノクローナル抗体の開発は従来のTリンパ球抑制とは異なる機構によってこれらの免疫細胞のネットワークを遮断するものと考えられる。従って、当該モノクローナル抗体は活性化マクロファージの関与する細胞性免疫の亢進によってもたらされる種々の疾患、例えば臓器移植拒絶 [E.S.Woodle, J.R. Thistlethwaite, L.K.Jolliffe et al., Transplant 52 : 361-368 (1991)]、自己免疫疾患；糖尿病 [T.Hutchings, H.Rosen, L.O'Reilly et al., Nature 348 : 639-642 (1990)、慢性炎症；リウマチ、肉芽腫、動脈硬化 [E.S.Woodle, J.R.Thistlethwaite, I.A.Ghobrial et al., Transplant. 52 : 354-360 (1991)]、脳血管障害 [市川、中川、重松ら、日本血栓止血学会誌 2 : p.420 (1991)] に対する免疫抑制剤としてその治療に有望である。

【0005】 抗TFモノクローナル抗体は血液凝固阻害を目的として開発されているが、上記の免疫抑制作用を主眼とし、それに有効なモノクローナル抗体は得られていない。例えば、これまでに免疫抑制を目的としたモノクローナル抗体としてヘルパーT細胞のCD3を認識するOKT3が臨床効果を示している。ところが、OKT3はTリンパ球機能を無差別に抑制するので、術後感染やリンパ球性白血病等の副作用をもち [E.S.Woodle, J.R.Thistlethwaite, I.A.Ghobrial et al., Transplant. 52 : 354-360 (1991), E.S.Woodle, J.R. Thistlethwaite, L.K.Jolliffe et al., Transplant 52 : 361-368

(1991)参照)、また、サプレッサーT細胞の機能も低下させるので、臓器移植においてトレランスの誘導も抑制され、臓器の生着に不利である[W.E.Paul編、in Fundamental Immunol. Second Ed. H.Auchincloss Jr. and D.H.Sachs: Transplantation and graft Rejection p.9 04-905. Raven Press, New York (1989)]。

【0006】細胞障害は抗体と補体の作用により行われることは公知の事実であり、抗体が活性化マクロファージに結合するだけではマクロファージ機能は影響されず、補体系の活性がおこってはじめてマクロファージ機能が抑制される。しかしながら、上記にある従来の抗TFモノクローナル抗体は全てIgG1アイソタイプであり、補体系の活性化はこれらIgG1アイソタイプでは行われず、IgM、IgG2によって効率よく誘導されることが知られている。したがってこのような背景から抗TFモノクローナル抗体には、IgMおよびIgG2アイソタイプが要求されている。

【0007】本発明の目的は、免疫抑制作用を主眼としたIgMおよびIgG2アイソタイプの抗TFモノクローナル抗体を提供することである。さらに本発明の他の目的は、抗TFモノクローナル抗体を用いた免疫抑制剤を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意検討した結果、公知のTFを特定のアジュバントを用いて免疫したマウスより得られた脾細胞を取り出し、これを骨髓腫細胞と細胞融合して得られた細胞(ハイブリドーマ)から従来の抗TFモノクローナル抗体とはアイソタイプの異なった抗TFモノクローナル抗体(IgG2aおよびIgM)が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。さらに、本発明者らはこれらの抗TFモノクローナル抗体が、補体と共同してマクロファージ機能を抑制すること、即ち活性化マクロファージによる細胞障害モノカインである腫瘍壊死因子(TNF)の産生を抑制すること、またリンパ球混合反応(mixed lymphocyte response; MLR)を補体と共同して阻害すること、さらにはヒト以外の種由来のTFとの交差性があることを見出した。

【0009】本発明の抗TFモノクローナル抗体は次の特性を有するモノクローナル抗体から選ばれるものである。

- ① Igクラス: IgG2aおよびIgM
- ② 認識抗原タイプ: 活性化マクロファージ細胞膜特異的マーカー組織因子
- ③ 交差反応性: IgG2a抗体はヒト胎盤由来組織因子、IgM抗体はヒト胎盤由来組織因子、イヌ、ウサギ胎盤由来組織因子と交差反応性を有する。
- ④ 補体存在下に活性化マクロファージによる腫瘍壊死因子(TNF)の産生を抑制する。

⑤ 補体存在下にリンパ球混合反応を抑制する。

【0010】本発明のモノクローナル抗体は、活性化マクロファージ特異的マーカー組織因子(TF)に対して反応性を有する。本発明のヒトモノクローナル抗体のクラスはIgG2aおよびIgMに分類される。

【0011】前記①～⑤の特性を有する本発明の抗TFモノクローナル抗体はそれぞれS147(IgG2aタイプ)、M22(IgMタイプ)と命名され、これらの抗体の産生細胞はそれぞれ微生物工業技術研究所において微工研菌寄第12778号、微工研菌寄第12777号として寄託されている。

【0012】上記モノクローナル抗体は、補体存在下に、ヒト混合リンパ球反応に対する抑制力を有する。特に、M22はその抑制活性が顕著である。当該補体としては、ヒト、モルモット、ウサギ起源のものが例示される。好適な補体の種類はウサギ補体である。当該補体は血清として添加してもよい。

【0013】本発明の抗TFモノクローナル抗体は、いわゆる細胞融合によって製造される。すなわち、抗体産生細胞と骨髓腫細胞との間に、ハイブリドーマを形成させ、該ハイブリドーマをクローン化し、上記活性化マクロファージ表面上の組織因子(TF)に対し特異性を有する抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。その操作は、免疫用細胞として下記の細胞を使用する以外は、従来既知の方法に準じればよい。

【0014】(1)抗体産生細胞

抗体産生細胞は、例えば公知の組織因子より得られる抗原によって免疫させた動物からの脾細胞、リンパ節細胞、B-リンパ球である。公知のTFとしては、ヒト由来天然型TF(分子量50kD、アミノ酸263個、糖蛋白)またはそのポリペプチド部分(分子量36kD)等が例示される。しかし、特に組換え組織因子(以下、r-TFと略記する)が好ましい。公知のヒト由来r-TFとしては、r-TF(分子量46kD、アミノ酸263個、糖蛋白、昆虫細胞により発現、Corvas社製)、大腸菌より発現したもの[分子量35kD、Gene, 98, 265 (1991)参照]等が例示される。免疫させる動物としてはマウス、ラット、馬、ヤギ、ウサギなどが例示される。このとき、被免疫動物への抗原への応答性を高めるため、アジュバントを抗原とともに投与する。本発明において用いられるアジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、Ribi(MPL)、Ribi(TDM)、Ribi(MPL+TDM)、百日咳ワクチン(Bordetella pertussis vaccine)、ムラミルジペプチド(MDP)、アルミニウムアジュバント(ALUM)、およびこれらの組合せが例示されるが、多様なエпитオプに対するモノクローナル抗体を誘導するため、特にRibi(MPL+TDM)が好ましい。

【0015】抗体産生細胞は、例えば次のようにして製

造される。即ち、市販の組換えTF抗原液(0.01~0.1% Lubrol PXを含む生理食塩水または等張リン酸緩衝液(PBS)に溶解して10~1000 μ g/mlとなるように調製)1容量に対し、アジュバント1容量をとって充分混和して乳化し、動物の免疫用として使用する。免疫は動物の皮下、筋肉内あるいは腹腔内にTFとして約1~20 μ g/回を注射することにより行われる。初回免疫から約1~2週間毎に1~4度免疫を行い(追加免疫)、さらに約1~4週間後に最終免疫を行う。最終免疫より約3~5日後、免疫動物から抗体産生細胞を分取する。抗体価は追加免疫5~6日後に酵素抗体法により行う。必要とするモノクローナル抗体がIgMクラスの場合には、追加免疫や最終免疫を行わず、初回免疫4日後に細胞融合に供することもある。これは一次免疫応答時にはIgM産生が優勢であることに基づいている。

【0016】(2) 骨髄腫細胞

骨髄腫細胞としては、マウス、ラット、ヒト等由来のものが使用される。例えばマウスミエローマP3X63-Ag8、P3X63-Ag8-U1、P3NS1-Ag4、SP2/0-Ag14、P3X63-Ag8 \cdot 653等が例示される。抗体産生細胞と骨髄腫細胞とは同種動物由来のものが好ましい。

【0017】(3) 細胞融合および融合細胞の選択

細胞融合は、例えばジー・ケーラー[Nature, 256, 495 (1975)]に記載の方法またはこれに準じる方法によって行われる。この際、30~50%ポリエチレングリコール(平均分子量1,000~4,000)を用いて30~40℃の温度下、約1~3分間程度反応させることにより行われる。細胞融合においては、骨髄腫細胞に対して1~10倍、好ましくは2~3倍の抗体産生細胞を用いることが好ましい。

【0018】得られた細胞を選択培地で培養して、モノクローナル抗体産生細胞、例えばハイブリドーマの分離を行う。選択培地は、親細胞株が死滅し、モノクローナル抗体産生細胞のみが増殖し得る培地であり、通常HAT(ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン)培地が使用される。

【0019】(4) クローニングおよび抗体の回収・精製

細胞融合によって得られた細胞は目的とするモノクローナル抗体を産生するクローンのスクリーニングに付される。すなわち、当該細胞を、マイクロプレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の抗体価を、例えば酵素抗体法などによって測定し、適切な抗体を産生しているウェルを得る。このようなウェルからさらに例えば限界希釈法によってクローニングを行って目的とするモノクローナル抗体を産生するクローンを得る。このクローンを、例えば予めプリスタンを投与したBALB/cマウスの腹腔内へ移植し、10~14日後にモノクローナル抗体を高濃度に含む腹水を採取し、検定する。得

られたクローンは、次いで目的とするモノクローナル抗体を産生するクローンのスクリーニングに付される。スクリーニングは、酵素抗体法などによって追跡される。選ばれたクローンの産生するモノクローナル抗体の回収は、免疫グロブリンの精製法として従来既知の硫酸分画法、ポリエチレングリコール分画法、エタノール分画法、陰イオン交換クロマトグラフィー法を応用することで、容易に達成される。

【0020】

10 【発明の効果】本発明の抗TFモノクローナル抗体は、活性化マクロファージ細胞膜に存在するTFに結合し、補体と共同してマクロファージ機能を抑制する。従って、当該抗体は、臓器移植拒絶の他、活性化マクロファージの関与する細胞性免疫の亢進によってもたらされる種々の疾患に対する免疫抑制剤として有用である。

【0021】

【実施例】以下、実施例を挙げてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

20 実施例1 抗TFモノクローナル抗体の調製

(1) 免疫原の調製

市販の組換えTF、r-TF(Corvas)を用い、界面活性剤の除去を以下の手順で行った。まず、r-TF(Corvas)100 μ g/4vialsを蒸留水1mlに溶解し、マウスアルブミン(2mg/ml蒸留水, CAPPEL)0.1ml、さらに冷アセトン(-40℃)4mlを添加した。これを-40℃にて一晩放置した後、遠心分離した(13,000 \times g, 15分)。得られたペレットを80%冷アセトン(-40℃)4mlに懸濁し、-40℃にて一晩保持した後、遠心分離した(13,000 \times g, 15分)。得られたペレットを0.05%Lubrol PX(半井化学)/0.9%NaClに溶解した。かくして得られた抗原液濃度は200 μ g/mlであった。

【0022】(2) アジュバントとの混合と免疫

(2-1) 抗TFモノクローナル抗体(S147/IgG2a)調製用
アジュバントとしては、初回免疫にALUM+百日咳(Bordetella pertussis;BP)菌体アジュバント、第2回免疫にフロイント不完全アジュバント(FIA)を用いた。初回免疫においては、ALUMアジュバント0.1mlと(1)にて得られたr-TFのLubrol溶液0.1ml(r-TF;10 μ g)とを混合し、等量にわけて2匹のマウス(BALB/c、雌、6週齢)に皮下注射した(背部皮膚4箇所)。当該ALUMアジュバント系の免疫では皮下注射4時間前にBordetella pertussis(半井化学)3 \times 10⁸菌体/0.5ml 0.9%NaClを腹腔注射しておく。4週間後、r-TFのPBS溶液0.2ml(r-TF;2.5 μ g)およびFIA0.2mlで追加免疫し、さらに3週間後、r-

TFのPBS溶液0.1ml (r-TF; 4 μ g) で最終免疫を行った (いずれも腹腔内投与)。最終免疫後3日後にマウス脾細胞を取り出し、以下の細胞融合に用いた。

【0023】 (2-2) 抗TFモノクローナル抗体 (M22/1gM) 調製用

アジュバントとしては、初回免疫にRibi (TDM+MPL) に、第2回免疫にフロイント不完全アジュバント (FIA)、第3免疫にRibi (TDM) を用いた。初回免疫においては、Ribi (TDM+MPL) アジュバント0.1mlと(1)にて得られたr-TFのLubrol溶液0.1ml (r-TF; 4 μ g) とを混合し、等量にわけて2匹のマウス (BALB/c、雌、6週令) に皮下注射した (背部皮膚4箇所)。4週間後、r-TFのPBS溶液0.05ml (r-TF; 4 μ g) およびFIA 0.05mlにて第2回免疫、さらに14週間後、r-TFのPBS溶液0.05ml (r-TF; 2.5 μ g) およびRibi (TDM) 0.05mlにて第3回免疫、さらに7週間後、r-TFの生理食塩水溶液0.1ml (r-TF; 5 μ g) にて最終免疫を行った (いずれも腹腔内注射による)。最終免疫後3日後にマウス脾細胞を取り出し、以下の細胞融合に用いた。

【0024】 (3) 細胞融合

上記(2)のマウス脾細胞と、2-amino-6-oxo-8-azapurine(8-Azaguanine) 耐性のBALB/cマウス骨髓腫細胞 (P3X63-Ag8.653) とを5:1の割合で混合し、ケーラーとミルステインの方法に準じて、ポリエチレングリコール (平均分子量1,500) を用いて2分間反応させることにより細胞融合を行った。反応液を遠心分離により洗浄した後、HAT培地 (10%FC*

*S含有RPMI1640培地に100 μ Mヒポキサンチン、0.4 μ Mアミノプテリン、16 μ Mチミジンを添加) に懸濁し、96ウェルマイクロプレートに100 μ l/ウェルずつ分注した後、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂含有空气中で培養を行った。培養開始後、3日後に100 μ lのHAT培地を添加し、以後2回/週の頻度で、半量ずつHAT培地で培地交換を行った。

【0025】 (4) 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニング

10 細胞の増殖が観察されたウェルの上清中の抗TF抗体価をELISA法により測定し、抗体陽性ウェルから限界希釈法により、求める細胞のクローニングを行った。

(ELISAによる測定方法) r-TF 5 μ g/mlを100 μ l/ウェル穴ずつグルタルアルデヒド処理アミノプレート (住友製) に固定した。このプレートにハイブリドーマ上清50 μ lを加えて室温で1時間反応させた。上清を捨て、洗浄後、第2抗体 (ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGとペルオキシダーゼ標識ヒトIgM (TAGO社製) の混合液) 50 μ lを加えて室温で2時間反応させた。第2抗体液を捨て、洗浄後、基質液を加えて10~20分反応させて、492nmの吸光度を測定した。対照の抗体としては、r-TF無処理プレートをを用いた。

(クローニング) クローニングは限界希釈法にて行った。1次スクリーニングで、TFに対する抗体が陽性と判断された細胞は、さらにクローニングを繰り返し抗TF抗体産生細胞を選別した。細胞融合およびスクリーニング結果を表1にまとめた。

【0026】

30 【表1】

細胞融合およびクローニング結果

免疫系	親株	脾臓細胞	96穴プレート		6穴プレート	
アジュバント (cells/ml)	(cells/ml)	播種穴数	増殖穴数	抗体陽性	抗体陽性	抗体陽性
<S147>						
ALLM+BP	5 $\times 10^5$	1.6 $\times 10^6$	288	124	82	28
<M22>						
Ribi	7 $\times 10^5$	3.3 $\times 10^7$	288	125	7	1
(TDM+MPL)						

【0027】 こうして、細胞S147-2-3、M22-8が樹立された。これらの細胞は安定にIgG2aタイプあるいはIgMタイプの抗TFモノクローナル抗体をそれぞれ産生し続ける。細胞S147-2-3、M22-8は微生物工業技術研究所において微工研菌寄第1

2778号 (FERM P-12778)、微工研菌寄第12777号 (FERM P-12777) としてそれぞれ寄託されている。

【0028】 (5) モノクローナル抗体の回収、精製

50 上記のスクリーニングによって得られたクローン株を、

予め0.5ml/匹プリスタンを投与した4週令のBALB/Cマウス(雄)の腹腔内へ $2.0 \sim 3.0 \times 10^7$ cell/匹移植し、10~14日後にモノクローナル抗体を高度に含む腹水を採取した。当該抗体粗標品1容量に対し、硫酸アンモニウムを1容量を攪拌しつつ滴下し、1時間放置後、遠心分離($10,000 \times g$, 30分)して上清を取り除いた。得られた抗体溶液を100倍容量のPBSに対して数回透析し、透析後、遠心分離($10,000 \times g$, 30分)して上清を得た。S147はMab Trap G (Pharmacia) にかけて精製した。280nmの吸光度をモニターしながら溶出し、吸収画分を集めた。M22は高速液体クロマト(以下、HPLCという。G3000SWカラム、東ソー社製)により精製した。

【0029】また精製抗体はHPLCで純度を確認した。HPLC分析結果を図1に示す。HPLCデータより、精製抗体の純度は、S147は100%であった。

【0030】実施例2 混合リンパ球反応抑制

実施例1にて樹立した抗TFモノクローナル抗体M22(IgMタイプ)、S147(IgG2aタイプ)、アジュバントとして初回免疫にL1b1(TDM)を用いて免疫する以外はS147と同様に行い調製した抗TFモノクローナル抗体E106(IgG1タイプ)、及びオルソクロンOKT3(ヤンセン協和/ヒトT細胞CD3に対するモノクローナルとして開発された特異的免疫抑制剤、マウスモノクローナル抗体IgG2a)の補体依存性ヒト混合リンパ球反応抑制効果を調べた。コントロールとしてIgM抗ガンモノクローナル抗体およびIgGポリクローナルマウスIgGを用いた。

【0031】(血球分離)ヘパリン添加した健常人静脈血50mlをFicoll-Hypaque遠心分離(1500rpm , 30分)し、PBS(-)で2倍希釈した血液25mlを分離液15ml上に界面が乱れないように重層する。中間層を採取し、等量の培養液で希釈した後、遠心分離(1000rpm , 10分)した。2回培養液で遠心洗浄し、細胞数カウントする(平均 5×10^7 単核球細胞(MNLC)が回収される。

【0032】(混合リンパ球反応)96ウェルマイクロプレートに、10%FCS含有IMDM培地を用い、上記血球分離操作で得られたドナーAおよびドナーBから得られたMNLC(2×10^6 cells/ml)を $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ蒔いた。このプレートに上記抗TFモノクローナル抗体またはコントロール($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)を $20 \mu\text{l}$ /ウェル、ウサギ補体(CEDARLANE) $20 \mu\text{l}$ /ウェルを加えて37℃で5日間反応させた。これにチミジン[Thymidine(methyl- ^3H), NEN, $20 \text{Ci}/\text{mmol}$, Sterile aqueous] $100 \text{uCi}/\text{ml}$ を $10 \mu\text{l}$ /ウェル加えさらに、37℃で6時間反応させた。 ^3H チミジン取り込み率をシンチレーションカウンターにて測定する。尚、当該リンパ球混合反応においては2者のリンパ球を無処理の

ままで芽球化をみる方法(two way)である。

【0033】結果を図2に示す。コントロール群に比べ、M22が最も高い抑制効果を示し、S147、E106の順に抑制が見られた。

【0034】実施例3 LPS刺激単球によるTNF産生抑制

マクロファージはリポポリサッカライド(LPS)によって活性化され、細胞障害性サイトカインTNF- α を産生する。実施例1にて樹立した抗TFモノクローナル抗体M22(IgMタイプ)、S147(IgG2aタイプ)、およびアジュバントとして初回免疫にL1b1(TDM)を用いて免疫する以外はS147と同様に行い調製した抗TFモノクローナル抗体E106(IgG1タイプ)を用い、LPS刺激マクロファージによるTNF- α 産生の抑制効果を調べた。コントロールとしてオルソクロンOKT3(IgG2aタイプ)、及びマウスIgGを用いた。

【0035】(1) LPS刺激

抗TFモノクローナル抗体またはコントロール($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)を $50 \mu\text{l}$ /ウェル、ウサギ補体(CEDARLANE) $50 \mu\text{l}$ /ウェルに加え、LPS($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)を $50 \mu\text{l}$ /ウェルを用いてLPS刺激を行う以外は実施例2で行ったのと同様に混合リンパ球反応を行い、培養上清をサンプリングし、以下のTNF ELISAに供した。

【0036】(2) TNF ELISA

TNF ELISA(ENDOGEN)キットの方法に従って行った。96ウェルマイクロプレートにマウス抗TNFモノクローナル抗体(マウス抗TNFモノクローナル抗体0.3ml+コーティングバッファー11.5ml)を $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ蒔き、37℃にて16~20時間培養し、3回洗浄した。このプレートに(1)で調製したサンプル、またはTNF標準品(10% FCS添加IMDM培地中、7500, 1500, 300, 60, 12 pg/ml)を $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ蒔き、37℃で2時間培養し、4回洗浄した。これに、抗TNF抗体[ウサギ多価抗TNF抗体 $250 \mu\text{l}$ +1%BSA/PBS(-)11.5ml]を $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ蒔き、37℃で1時間反応させ、4回洗浄した。さらに、Alp-linked 抗ウサギIg[Alkaline-phosphatase linked ヤギ抗ウサギIg $200 \mu\text{l}$ +1%BSA/PBS(-)12ml]を $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ蒔き、37℃で1時間反応させ、4回洗浄した。これに基質[基質タブレット(p-NPP)5mg+基質バッファー12ml]を $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ蒔き、室温で1時間反応させた後、405nmまたは410nmにて吸光度を測定した。

【0037】補体存在下、抗TFモノクローナル抗体によるLPS刺激によるTNF- α の産生抑制を図3に示した。S147及びM22は、OKT3同様にTNF産

生を抑制した。

【0038】実施例4 交差反応性

実施例1にて樹立した抗TFモノクローナル抗体M22 (IgMタイプ)、S147 (IgG2aタイプ)、およびアジュバントとしてL1b1 (TDM)を用いて免疫する以外はS147と同様に行い調製した抗TFモノクローナル抗体E106 (IgG1タイプ)のヒト胎盤および2種の実験動物(イヌ、ウサギ)の脳より精製したTFとの交差反応性をドット・プロットング及びウェスタンプロットングにより調べた。

【0039】ヒト胎盤由来TFは、ヒト胎盤のアセトン及びヘプタン/ブタノール処理パウダーより2% Triton X-100抽出、F. VII. カラムクロマトグラフィー[G. J. Broze et al., J. Biol. Chem. 260:10917-20 (1985)]により精製した画分を用いた。イヌ及びウサギTFは、イヌ及びウサギの脳のアセトン処理パウダーより、2% Triton X-100抽出、F. VII. カラムクロマトグラフィーにより精製した画分より得た。

【0040】(1) ドット・プロットング

ニトロセルロース膜(ミリポア-HA, 0.45 μ m) 20
を25mM Tris, 192mMグリシン, 20% メタノール, pH 8.3*

* (Blotting Buffer)に浸漬し平衡化後、Bio-Dot Apparatus (Bio-Rad)にセットした。検体(上記各種TF)を各ウェルに添加し吸引して膜に吸着させた。次に膜を取り外し、3%スキムミルクに浸漬し、室温で1.5時間振盪してブロッキングした。TBS (20mM Tris, 0.15M NaCl, pH7.5)で軽くすすぎ、必要に応じて切断し、抗TFモノクローナル抗体(1% BSA/PBS(-)で10 μ g/mlに調製、又は培養上清原液)に浸漬して室温で1時間振盪して反応させた。冷TBSで洗浄(10分×3)後、ペルオキシダーゼ標識マウスIgG+M (TAGO社4543を1% BSA/PBS(-)で500倍希釈)に浸漬し、室温で2時間振盪して反応させた。冷TBSで洗浄(10分×3)後、4-クロロ-1-ナフトール/H₂O₂に約20分間浸漬して発色させた。

【0041】肉眼的にみた発色強度の結果を表2に示す。S147はヒト胎盤由来TFと、M22はヒト胎盤および2種の実験動物(イヌ、ウサギ)由来TFと交差反応性を示した。

【0042】

【表2】

抗TFモノクローナル抗体の各種TFとの反応性

MoAb	r-TF	ヒト胎盤TF	イヌ脳TF	ウサギ脳TF
S147	+++	+	-	-
M22	++++	+++	++	+
E106	++	-	-	-

発色強度: +, 陰性: -

【0043】次にM22の種間交差性を定量化した。r-TF、ヒト胎盤由来TF、イヌ脳、ウサギ脳由来TF (20 μ g/ μ l)を2倍希釈系列でドットプロットを行った。反応性発色が見られる最少TF濃度で比較した(表3)。ヒト胎盤由来TFに比べ、イヌ脳由来TFは

16分の1、ウサギ脳由来TFは64分の1の結合交差性を示した。

【0044】

【表3】

M22抗体の各TFへの反応性比較(ドットプロット)

	反応性	比
ヒト胎盤TF	0.16	1
γ -TF	0.03	1.6
イヌ脳TF	0.63	0.063 (1/16)
ウサギ脳TF	2.5	0.016 (1/64)

反応性: 発色が見られる最少TF濃度 (ng/ml)

【0045】(2) ウェスタンブロッティング
TF試料25 μ lに0.5M Tris-HCl, pH6.8を5 μ l、10%SDS8 μ l、メルカプトエタノール2 μ lを添加し37℃で2時間静置し、SDS電気泳動用試料とした。分子量マーカーはファルマシア低分子量マーカーを用いた。電気泳動はラエミリの方法に準じ、ゲルはT E F C OのSDS PAGE mini 4-20% 1mm 10laneを用いた。泳動は20mAで約70分間行った。泳動終了後、ゲルをBlotting Bufferに浸漬(15分 \times 2)し平衡化した。転写膜にはImmobilon PVDF膜(第一化学薬品)を用いた。転写前に100%メタノールに約20秒浸し、Blotting Bufferに浸して5分以上振盪して平衡化した。転写はT E F C Oの装置で180mAで1時間行った。転写後、膜は必要に応じて切断し、分子量マーカーの部分はクマジー-R-250(0.2%クマジー-R-250/40%メタノール/10%酢酸)で染色した。検体の部分は(1)のドット・ブロッティングに準じて、或いはImmunogold Silver Stainにより、抗体の反応するバンドの検出を行った。

【0046】M22を用いたウェスタンブロッティングを行った。結果を図4に示す。イヌ脳由来TFは58kDa, γ -TFは46kDa, ヒト胎盤由来TFは50

kDaに主バンドが認められた。これらは報告されているヒト脳由来TFの分子量46kDaに近似している。

【0047】実施例5 凝固阻害性
実施例1にて樹立した抗TFモノクローナル抗体M22(IgMタイプ)、S147(IgG2aタイプ)、およびアジュバントとして初回免疫にLib1(TDM)を用いて免疫する以外はS147と同様に行い調製した抗TFモノクローナル抗体E106(IgG1タイプ)を用い、ヒト単球性白血病細胞株Ret-1ホモゲネート、イヌ及び脳ホモゲネート(0.1%)による血液凝固に対する阻害活性を調べた。

【0048】各実験動物由来のTF50 μ lに上記抗TFモノクローナル抗体50 μ lを加えて37℃で30分間インキュベートし、ヒト血漿0.1mlを加え、25mM CaCl₂ 0.1mlを添加し、Amerlung Calculator(BAXTER社製)で凝固時間を測定した。

【0049】結果を表4に示す。S147はヒトTFの凝固能を阻害したが、イヌ、ウサギ由来TFの凝固には影響を与えなかった。一方、M22はヒト、イヌ由来TFの凝固を阻害した。

【0050】

【表4】

凝固阻害活性

Mab	ヒトTF	イヌTF	ウサギTF
S147	↓	→	→
E106A		→	→
M22	↓	↓	→

↓ : 顕著な阻害を示す

↓ : 阻害を示す

→ : 変化なし

【図面の簡単な説明】

【図1】精製抗体 (S147) のHPLC分析結果を示す。

【図2】補体存在下/非存在下での抗TFモノクローナル抗体による混合リンパ球反応 (MLR) におけるTリ

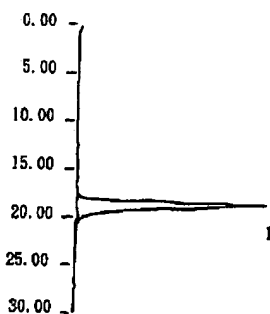
ンパ球DNA合成阻害効果を示す。

【図3】補体存在下での抗TFモノクローナル抗体によるLPS刺激単球におけるTNF産生抑制効果を示す。

【図4】M22によるウェスタンブロッティング結果を示す。

【図1】

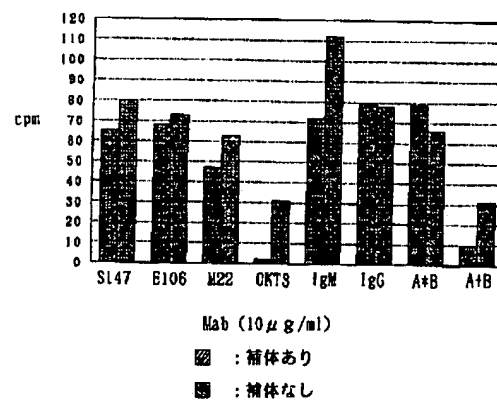
精製抗体 (S147) のHPLC分析



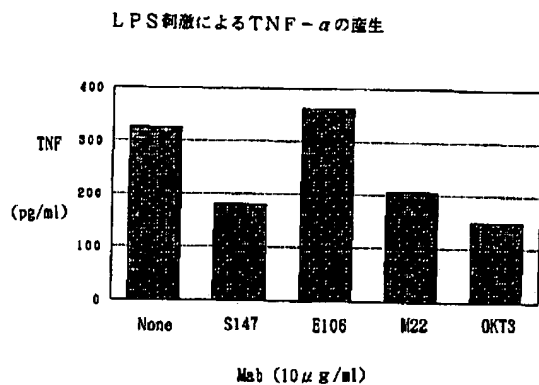
ID#	RET TIME	HEIGHT	MARK	AREA	CONC %
1	18.6027	128529.7	F	6025285.5	100.0000
TOTAL		128529.7		6025285.5	100.0000

【図2】

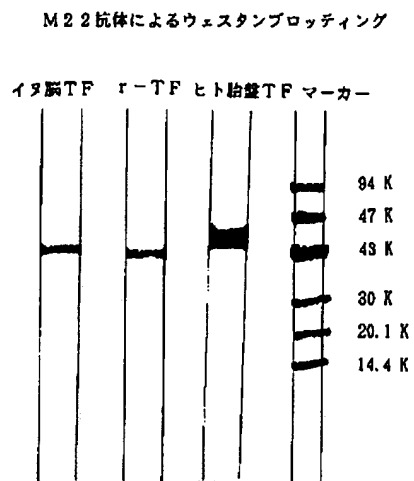
Mab及び補体の混合リンパ球反応(MLR) 反応抑制



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁵

C12R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 平間 稔

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株
式会社ミドリ十字中央研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.